

麻疹病毒 N 蛋白原核表达 纯化条件的优化

侯丹丹¹, 王云龙¹, 张怡青¹,
孙新城², 李玉林³, 米海³, 王继创³, 程蕾³

- (1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;
2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
3. 河南省生物工程技术研究中心, 河南 郑州 450001)

摘要: 通过构建重组表达质粒, 诱导表达纯化麻疹病毒 N 蛋白. 将麻疹病毒 N 蛋白基因片段与载体 pET-32a(+) 相连接, 通过 PCR 方法扩增获得重组质粒 pET-32a(+)/N, 然后将重组质粒转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 内, 并优化诱导表达时间、温度、诱导剂浓度等条件. SDS-PAGE 和 Western blot 蛋白印迹检测表明, 麻疹病毒 N 蛋白分子质量约为 60 kD, 表达产物用 Ni-NTA 亲和层析和 DEAE 纯化后, 纯度达 90%.

关键词: 麻疹病毒; 核壳蛋白; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: Q786.4 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.06.008

Optimization of measles virus N protein's prokaryotic expression and purification

HOU Dan-dan¹, WANG Yun-long¹, ZHANG Yi-qing¹, SUN Xin-cheng²,
LI Yu-lin³, MI Hai³, WANG Ji-chuang³, CHENG Lei³

- (1. College of Life Science He'nan Normal University Xinxiang 453007, China;
2. College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China;
3. He'nan Biotechnology Research Center Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to construct a recombinant expression plasmid which induced express purification measles virus (MV) N protein, the recombinant plasmid of pET-32a(+) /N amplified by PCR from MV N protein genes was inserted into expression vector pET-32a(+), then it was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The condition of time, temperature and concentration of IPTG were optimized. The results of SDS-PAGE and Western blot tests showed that MV N protein molecular was 60 kD. The protein's purity was 90% after being purified by Ni-NTA and DEAE.

Key words: measles virus; N protein; prokaryotic expression; protein purification

收稿日期: 2013-04-12

作者简介: 侯丹丹(1985—), 女, 河南省许昌市人, 河南师范大学硕士研究生, 主要研究方向为微生物。

通信作者: 王云龙(1962—), 男, 河南省洛阳市人, 河南师范大学教授, 主要研究方向为生物制药。

0 引言

麻疹是一种高度传染的呼吸道疾病,具有典型的临床症状,包括斑丘疹、发热、咳嗽、鼻炎和结膜炎。麻疹病毒是麻疹的病原体,分类上属于副黏病毒科麻疹病毒属。麻疹病毒可以划分为 8 个基因组(A—H) 21 个基因型。核壳蛋白(N 蛋白)是麻疹病毒的主要抗原,可产生中和(Nt)抗体。在研究基因工程麻疹疫苗中,N 蛋白基因是首选的病毒抗原^[1],它是麻疹病毒颗粒中含量最多的蛋白,并且是麻疹病毒在繁殖和转录过程中第一个被合成的蛋白,一般由 525 个氨基酸残基组成,分子量为 60 kD。N 蛋白主要是以磷酸化的形式存在,并同病毒的 RNA 结合形成多聚复合物,该复合物表现相当稳定,可以抵抗高盐的环境。当前利用基因工程方法表达麻疹病毒蛋白已有不少报道^[2-5]。N 蛋白诱导表达主要采用载体 pET-28a(+) 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行,通过 Ni-NTA 亲和层析获得的高纯度目的蛋白用于 ELISA 检测。本实验拟选择麻疹病毒 N 蛋白基因片段,构建原核表达载体,以期经诱导表达和纯化,获得目的蛋白。

1 实验

1.1 材料

1.1.1 质粒和宿主菌 pUC19/N 由河南省生物工程技术研究中心提供;载体 pET-32a(+),购自 Novagen 公司;E. coli BL21(DE3) 大肠杆菌菌株由本实验室保存。

1.1.2 引物的设计 依据表达质粒和 N 蛋白基因编码区设计引物,上游引物 5'-CGCGGATCCATGTTGGAGGTTGTCAG-3'(含 BamH I 酶切位点),下游引物 5'-CCCAAGCTTCTAGTCTAGAAGGTTCTCT-3'(含 Xho I 酶切位点),由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.3 主要试剂 BamH I, Hind III 限制性内切酶, T4 DNALigase 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 胶回收试剂盒、异丙基硫代-β-半乳糖苷(IPTG) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET-32a(+)/N 载体构建及转化 1) 依据 N 蛋白基因编码区设计引物,建立 30 μL PCR 反应体系(20 × buffer, 1.5 μL; MgCl₂, 0.3 μL; dNTP, 0.3 μL; 上游引物, 0.2 μL; 下游引

物, 0.2 μL; DNA 聚合酶, 0.3 μL; 模板, 0.5 μL; dd H₂O, 4 μL) 扩增目的基因片段,扩增产物与 pET-32a(+) 载体经 BamH I, Xho I 双酶切后,由 T4 DNA 连接酶连接双酶切产物而构建重组质粒 pET-32a(+)/N; 2) 将质粒转入宿主细胞大肠杆菌中,接种于 1 mL LB 液体培养基中,37 °C 摇床培养 1 h,然后取菌液 50 μL 转接于 3.5 mL LB(含 Amp 30 mg/mL) 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀ 约为 0.3~0.5,加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,诱导表达 5 h,分别进行 12% SDS-PAGE 分析; 3) 将表达菌送上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.2 重组菌的小样诱导表达及条件的优化

1) 温度诱导: 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 下,分别于 30 °C, 37 °C 和 42 °C 诱导表达 5 h。2) IPTG 浓度诱导: 在 37 °C, IPTG 浓度分别为 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L, 诱导表达 5 h。3) 时间诱导: 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 37 °C 条件下,分别诱导 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h。取表达产物各 1 mL 以 1 000 r/min 破碎离心 5 min,离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 分析。

1.2.3 重组菌大样的诱导表达 按小样最佳诱导条件,取表达稳定的菌液 1 mL 接于 1 000 mL LB 液体培养基(含 Amp 30 mg/mL),进行大样诱导表达,收集菌液,4 500 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 0.05 mol/L PB 洗涤沉淀,再次离心后收集沉淀。

1.2.4 N 蛋白的纯化及 Western blot 蛋白印迹验证 将收集的沉淀用 0.05 mol/L PB(pH = 7.8) 溶解,在冰浴条件下超声破碎,将破碎的菌液 8 000 r/min 离心 15 min,取上清过 Ni-NTA 亲和层析柱和 DEAE 柱纯化,Western blot 蛋白印迹验证。

2 结果与讨论

2.1 N 蛋白基因的克隆及 pET-32a(+)/N 表达载体构建

PCR 产物电泳结果见图 1,在 1 452 bp 左右有一条目的带,与测序结果相符。诱导表达结果见图 2,与 BL21 空菌和未诱导重组菌相比,上清中约在 60 kD 处有目的条带,大小与预期值相符。

测序结果表明表达菌含 N 蛋白基因片段,即重组质粒构建成功。

2.2 目的蛋白的表达及条件的优化

温度梯度诱导结果见图 3,37 °C 表达量最大; IPTG 梯度诱导结果见图 4, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L

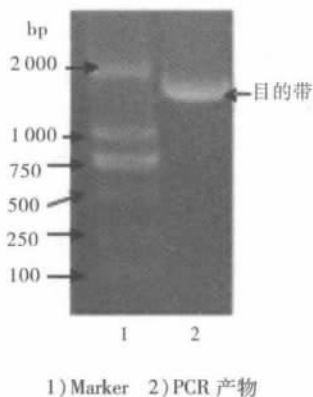


图 1 PCR 产物电泳结果

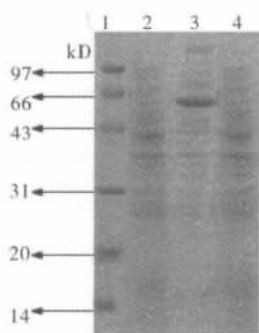


图 2 诱导表达结果

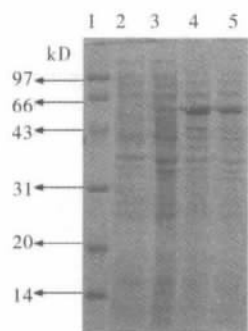


图 3 温度梯度诱导结果

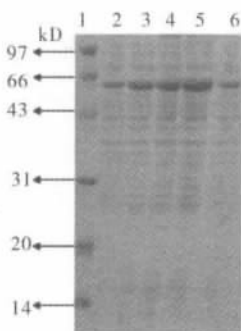


图 4 IPTG 梯度诱导结果

时最优; 时间梯度诱导结果见图 5 4 h 时菌体表达量最优. 综上可知 37 °C IPTG 浓度为 0.2 mmol/L , 诱导 4 h 条件下 ,目的蛋白的表达结果最佳.

2.3 目的蛋白的纯化及 Western blot 蛋白印迹验证

目的蛋白经 Ni 柱和 DEAE 纯化后 SDS-PAGE 检测结果见图 6. Western blot 免疫印迹结果见图 7. 纯化后蛋白浓度的测定结果为 $A_{280} = 2.704$,根据标准 N 蛋白吸光度值与蛋白浓度之间的转换关系 $A = 0.963$ 时相当于蛋白浓度为 1.0 mg/mL ,可粗略计算出所纯化的 N 蛋白浓度约为 3.0 mg/mL ,最终

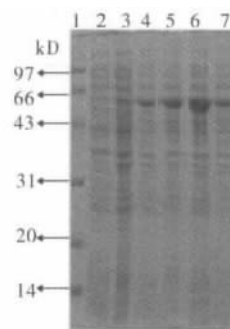


图 5 时间梯度诱导结果

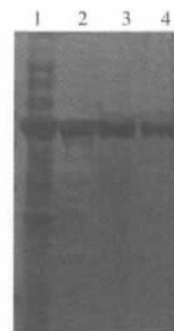


图 6 纯化结果

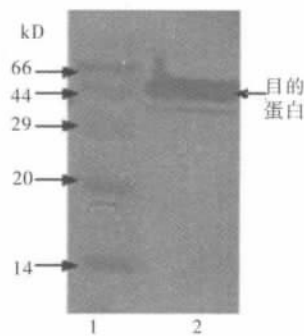


图 7 免疫印迹结果

(下转第 47 页)

表 1 PPC 熔体不同剪切速率下的黏流活化能

剪切速率/(s ⁻¹)	600	800	1 000	1 200	1 400	1 600
E_a /(kJ·mol ⁻¹)	13.69	10.22	9.61	8.18	8.03	6.12

PPC 材料 E_a 的大小反映了聚合物熔体对温度的敏感性.从表 1 知,PPC 材料熔体的黏流活化能随着剪切速率的增加而降低,表明其黏度随剪切速率的增加对温度的敏感性降低.

3 结论

本文利用差示扫描量热分析仪、热重分析仪、电子拉力机、熔体流动速率仪和毛细管流变仪等对聚甲基乙撑碳酸酯(PPC)热性能、力学性能和熔融流变行为进行了研究.结果表明:

1) PPC 具有较低的玻璃化转变温度和较差的热稳定性能,其中 $T_g = 31\text{ }^\circ\text{C}$,失重率 5% 时的温度为 $211.3\text{ }^\circ\text{C}$.

2) PPC 的力学性能较差,其拉伸强度和断裂伸长率分别为 7.50 MPa 和 536.63% .

3) PPC 熔体的流动速率随温度的升高有所增加,这为 PPC 的成型加工工艺制定提供了依据.

4) 由 PPC 熔体表观黏度与剪切应力和剪切速率关系曲线可以发现,PPC 熔体是典型的非牛顿假塑性流体,表观剪切黏度随剪切速率的增加而降低.

5) PPC 熔体的表观黏度随温度的增加而降低,

流动活化能随剪切速率提高而降低,表明其表观黏度对温度较敏感,在 PPC 成型加工工艺条件制定时,可采用升高加工温度和剪切速率的方法来提高其熔体的流动性.

参考文献:

- [1] Inoue S, Koinuma H, Tsuruta T. Copolymerization of carbon dioxide and epoxide [J]. Journal of Polymer Science (Part B): Polymer Letters, 1969, 7(4): 287.
- [2] Inoue S, Koinuma H, Tsuruta T. Copolymerization of carbon dioxide and epoxide with organometallic compounds [J]. Macromolecular Chemistry and Physics, 1969, 130(1): 210.
- [3] 王秋艳,翁云宣,许国志.聚甲基乙撑碳酸酯的研究进展[J].中国塑料,2011,25(1):9.
- [4] Wang S J, Du L C, Zhao X S, et al. Synthesis and characterization of alternating copolymer from carbon dioxide and propylene oxide [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2002, 85: 2327.
- [5] Zhu Q, Meng Y Z, Tjong S C, et al. Thermally stable and high molecular weight poly(propylene carbonate)s from carbon dioxide and propylene oxide [J]. Polymer International, 2002, 51(10): 1079.
- [6] Yoo S J, Lee S H, Jeon M, et al. Effects of compatibilizers on the mechanical, morphological and thermal properties of poly(propylene carbonate)/poly(methyl methacrylate) blends [J]. Macromolecular Research, 2013, 21(11): 1182.

(上接第 34 页)

收集纯化后 N 蛋白的体积约为 35 mL, Ni 柱亲和层析纯化所得蛋白质量约为 105 mg.

由图 7 可见,纯化后的麻疹 N 蛋白与相应抗体产生特异性反应,证明该蛋白有较好的抗原性.

3 结论

本研究将麻疹病毒核壳蛋白基因导入到大肠杆菌中,选择 pET-32a(+) 载体,得到重组表达质粒 pET-32a(+)/N. 同时对温度、时间、诱导剂浓度等诱导条件进行优化.实验发现,在温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$,诱导时间 4 h, IPTG 浓度 0.2 mmol/L 的条件下目的蛋白表达量最高.选择 Ni^{2+} 配体亲和层析和 DEAE 柱纯化后,蛋白纯度高达 90%. 此蛋白表达纯化系统的建立和优化将会对 MV 病毒 N 蛋白的纯化和进一步探讨其功能提供依据.

参考文献:

- [1] 马雷钧,陈志慧.麻疹病毒流行株主要结构蛋白的基因变化[J].国外医学预防诊断治疗用生物制品分册,2002,25:6.
- [2] 王伟,王海梅. RT-PCR 法检测尿液标本中麻疹病毒核蛋白(N)基因的临床应用及意义[J].山西医科大学学报,2012,43(12):118.
- [3] Sousa E, Agudelo-Suárez A, Benavides F G, et al. ITSAL project: Immigration, work and health in Spain: the influence of legal status and employment contract on reported health indicators [J]. Publ Health, 2010, 55(5): 443.
- [4] 陈真,卢亦愚.麻疹核蛋白基因的表达及检测应用的研究[J].中国卫生检验杂志,2009,19(5):123.
- [5] Willen S. How is health-related "deservingness" reckoned? Perspectives from unauthorized immigrants in Tel Aviv [J]. Soc Sci Med, 2012, 74(6): 812.